

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT UND ZUR RESORPTION
VON HUMAN-INSULIN UND HUMAN-PROINSULIN
BEIM KANINCHEN

Christine Kalteis

Diss
München
1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554610_0074

Aus der

III. Medizinischen Abteilung des
Städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen
- Akademisches Lehrkrankenhaus -

Leiter: Prof. Dr. K. D. Hepp

und der

Abteilung für Nuklearbiologie
Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH

Leiter: Prof. Dr. H. Kriegel

Vergleichende Untersuchungen
zur biologischen Aktivität und zur Resorption
von Human-Insulin und Human-Proinsulin
beim Kaninchen

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Christine Kalteis

München

1986

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter

Prof. Dr. K. D. Hepp

Mitberichterstatter

Dekan

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung

6. Mai. 1986

MEINER MUTTER IN FREUDE

Inhaltsverzeichnis

=====

1. Einleitung

- 1.1 Biosynthese von Proinsulin und Insulin
- 1.2 Spaltung von Proinsulin zu Insulin
- 1.3 Gentechnologische Herstellung
- 1.4 Biologische Eigenschaften
- 1.5 Biologische Aktivität
- 1.6 Bindung an den Rezeptor

2. Zielsetzung

3. Versuchsplan

- 3.1 Versuchstiere
- 3.2 Äquipotente Dosen
- 3.3 Applikationen
- 3.4 Probenahme

4. Bestimmungsmethoden

- 4.1 Blutglucose
- 4.2 Insulin und Proinsulin
 - 4.2.1 Tracer-Methode
 - 4.2.2 Radioimmunoassay

- 5. Versuchssubstanzen
 -
 - 5.1 Herstellung der Substanzen
 - 5.2 Kontrolle der radioaktiven Lösung
- 6. Darstellung der Ergebnisse
 -
 - 6.1 Injektion von J125 Human-Insulin
 - 6.1.1 Intravenöse Injektion
 - 6.1.2 Intraperitoneale Injektion
 - 6.1.3 Subcutane Injektion
 - 6.2 Injektion von J125 Human-Proinsulin
 - 6.2.1 Intravenöse Injektion
 - 6.2.2 Intraperitoneale Injektion
 - 6.2.3 Subcutane Injektion
 - 6.3. Injektion von J125 Human-Insulin und J125 Human-Proinsulin
 - 6.3.1 Intravenöse Injektion
 - 6.3.2 Intraperitoneale Injektion
 - 6.3.3 Subcutane Injektion
 - 6.4 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse
- 7. Zusammenfassung
 -
- 8. Diskussion
 -
- 9. Anhang
 -
- 10. Literatur
 -
- 11. Lebenslauf
 -

1.1 Biosynthese von Proinsulin und Insulin.

Das Insulingen, von dem die Insulinbiosynthese ausgeht, ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert (Patzelt, C., 1978). Der RNA-Abschnitt der Desoxyribonukleinsäure wird zur messenger-RNA und verläßt mit der Information Praelproinsulin den Zellkern. Zunächst entsteht im Zytoplasma, im Bereich des rauen endoplasmatischen Retikulums (RES) das Praelproinsulin.

Diese kurzlebige Vorstufe ist ein einkettiges Polypeptid von etwa 100 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 12000. Nach Abspaltung von ca. 20 Aminosäuren entsteht das Proinsulin, mit einem Molekulargewicht von ca. 9000, welches über Mikrovesikel in den Golgi-Apparat gelangt (Abb.2).

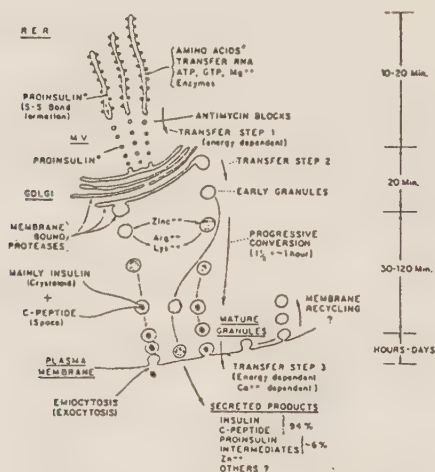


Abb.2 Insulinbiosynthese in den β -Zellen des Pankreas (Rubenstein, A. H., Clark, J. L., Melani, F., Nature, 224, 698 (1969)).

Vom Golgi-Apparat schnüren sich frische Granula ab, die das Proinsulin speichern. Die Abspaltung des C-Peptids erfolgt im Verlauf der weiteren Reifung der Granula, die schließlich das fertige Insulinmolekül und das C-Peptid enthalten. Die reifen Granula wandern nun entlang dem mikrotubulären System zur B-Zellmembran, mit der sie dann verschmelzen (Hepp, K. D., 1984).

1.2 Spaltung von Proinsulin zu Insulin.

Zur Spaltung des Proinsulins sind zwei Umwandlungsenzyme notwendig. Die Trypsin-ähnliche Endopeptidase öffnet die Polypeptidreihe an der Arg-Gly-Sequenz am Anfang der A-Kette des Insulins und an der Arg-Thr-Sequenz, gerade jenseits des Carboxylrestes der B-Kette, während die Ektopeptidase, die Carboxypeptidase B, vorwiegend die Carboxyl-endständigen basischen Reste entfernt (Abb. 3).

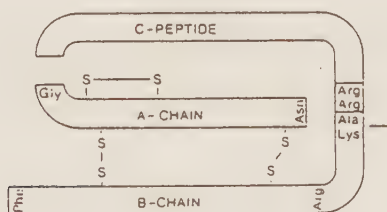


Abb.3 Spaltung von Proinsulin (Rubenstein, A. H. et al., Nature, 224, 698 (1969)).

Diese Umwandlung ist energieabhängig und kann durch Stoffe blockiert werden, die die oxidative Phosphorylierung unterbinden z.B. Antimycin und Dinitrophenol (Rubenstein A., 1969).

Die Umwandlung von Proinsulin in Insulin erfolgt in den Betazellen nicht quantitativ. Bei der Ausschüttung des Granulainhalts in den Extrazellulärraum wird zugleich mit Insulin und C-Peptid immer intaktes Proinsulin ausgeschüttet.

Bisher kann dem C-Peptid keine physiologische Funktion zugeschrieben werden. Bei Diabetikern, die Insulinantikörper entwickelt haben oder unter Insulinapplikation stehen, liegt seine klinische Bedeutung bis heute lediglich in der Bestimmung der Pankreasrestfunktion (Rubenstein et al., 1972).

Das Proinsulin wird zur Diagnostik der Insulin-produzierenden Tumore des Pankreas, der Insulinome, verwendet. Neoplastische B-Zellen sezernieren nicht nur vermehrt Insulin sondern auch in einem weit höheren Anteil das Proinsulin.

Obwohl der Nachweis einer notwendigen biologischen Wirkung des Proinsulins aussteht, läßt doch seine Sekretion zusammen mit dem Insulin, daran denken, daß ein physiologischer Nutzen des Proinsulins besteht.

1.3 Gentechnologische Herstellung von Proinsulin

Während Human-Proinsulin früher nur aus menschlichem Pankreas gewonnen werden konnte, ist heute eine biosynthetische Herstellung mit Hilfe der Gentechnologie möglich. Dadurch ist es gelungen, Proinsulin in ausreichenden Mengen für wissenschaftliche Untersuchungen zu produzieren.

Human-Proinsulin wird durch Biosynthese in E. Coli K 12 Bakterien hergestellt, einem Laborstamm, der im menschlichen Organismus nicht lebensfähig ist.

Die Proteinsynthese in Bakterienzellen bezieht ein spezielles Element ein, das in höheren Organismen nicht vorhanden ist.

Dieses ringförmige Plasmid fungiert neben den Chromosomen als Genträger.

Die Plasmide werden enzymatisch geöffnet, neue synthetische DNS-Ketten, die das Programm für eine der beiden Peptidketten des Human-Proinsulins tragen, eingefügt und wieder geschlossen.

Daraufhin werden sie in lebende Bakterienzellen eingebracht, die sich, ausgestattet mit der neuen Eigenschaft, die Polypeptidketten des Proinsulins zu produzieren, vermehren.

Es wird dadurch eine Kolonie von Organismen gegründet, deren Zellen alle "rekombiniertes Plasmid" enthalten und somit zu einer ganz spezifischen Proteinsynthese fähig sind (Burnett, I. P., 1982).

1.4 Biologische Eigenschaften von Proinsulin

Bezüglich der biologischen Eigenschaften herrscht in der Literatur weitgehend Übereinstimmung, daß Proinsulin dieselben Stoffwechselvorgänge stimuliert wie Insulin.

Die Plasmakonzentrationen werden mit ca. 5-48% der Insulinkonzentrationen angegeben (Melani et al., 1970 und Sherman et al., 1971).

Das Konzentrationsverhältnis ist abhängig von der jeweiligen Stoffwechsellaage. Die Proinsulinkonzentrationen liegen nach Nahrungsaufnahme bei 5-10% und steigen im Nüchternzustand auf 50% der Insulinkonzentration an (Kitabchi A. E., 1970).

Diese Veränderungen lassen Rückschlüsse auf einen unterschiedlichen Metabolismus zu (Abb. 4). Frank und Veros (1972) berichten über einen verlangsamten Abbau des Proinsulins in der Leber, im Vergleich zum Insulin.

Dadurch ist die Halbwertszeit im Plasma verlängert : Insulin 3-4 Minuten, Proinsulin 15-25 Minuten. (Steiner, D. F. und Rubenstein, A. H., 1972.)

Die renale Clearance von Proinsulin und Insulin ist annähernd gleich. Die metabolische Clearance-Rate beider Substanzen fällt mit steigender Konzentration im Blut ab.

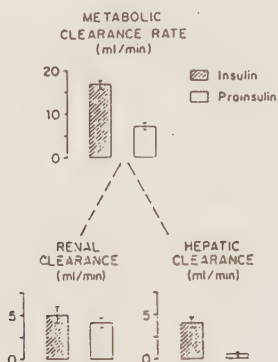


Abb. 4 Vergleich der metabolischen Clearance-Rate von Insulin und Proinsulin bei Ratten (Steiner et al., J. Clin. Endocr. Metab. 35, 402 (1972)).

1.5 Biologische Aktivität von Proinsulin

Die biologische Aktivität wird in der Literatur nicht einheitlich beurteilt.

Es wird über eine vergleichbare antilipolytische Eigenschaft von Proinsulin und Insulin berichtet, die äquimolar angewandt, bei isolierten Fettzellen die katecholamin-stimulierte Lipolyse supprimieren (Faulhaber et al., 1972 und Robbins et al., 1984).

Gliemann und Sörensen (1969) fanden bei isolierten Hodenfettzellen jedoch nur eine lipolytische Aktivität von 1-2%, verglichen mit der des Insulins.

Bei in vivo Untersuchungen an Maus (Chance et al., 1968), Ratte (Lazarus et al., 1970 und Puls und Kroneberg, 1969), Schwein und Affe (Stoll et al., 1971) sowie am Menschen (Galloway, J. A. 1969, Fineberg, S. E. 1970), erwies sich Proinsulin im Vergleich zum Insulin bezüglich seiner hypoglykämischen Eigenschaften als biologisch schwächer. Bezogen auf die Molekulargewichte, lag die Proinsulinwirkung zwischen 10 und 30% der Insulinwirkung.

Schatz et al., (1984) fanden beim Kaninchen eine Proinsulinaktivität, die ca. 60% der Insulinaktivität betrug.

1.6 Bindung an den Rezeptor

Die Interaktion von Proinsulin mit Insulin-spezifischen Rezeptoren wird seit langer Zeit diskutiert.

Es wird vermutet, daß Proinsulin unmittelbar an den Insulinrezeptor gebunden und nicht nach der Bindung in Insulin umgewandelt wird.

Freychet et al., (1974) berichten über eine kompetitive Verdrängung des Insulins von seinem Rezeptor durch Proinsulin.

Durch in vitro Versuche mit menschlichen Hepatozyten konnten sie eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Rezeptorverdrängung des Insulins und der biologischen Wirkung des Proinsulins herstellen.

Podlecki et al., (1984) fanden, daß die Proinsulinbindungskapazität an Rattenadipozyten 11% der Insulinbindungskapazität betrug.

Prager et al., (1982) verglichen die Bindungseigenschaften von Human-Insulin und Human-Proinsulin an Leukozyten von gesunden Probanden und fanden eine signifikant höhere Zellbindung von Insulin (Faktor 100). Proinsulin in höheren Konzentrationen konnte Insulin vom Rezeptor verdrängen, während niedrige Proinsulinkonzentrationen keinen Einfluß auf die Bindungskapazität von Insulin hatten.

Diese Aussagen stehen in Widerspruch zu Ergebnissen von Schlüter et al., (1982) die über eine Verstärkung der Insulinwirkung, als Folge einer Stimulation der Insulinbindung durch Proinsulin, berichten. Nach Präinkubation mit Proinsulin, zeigten frisch isolierte menschliche Monozyten von gesunden Probanden und Diabetikern eine deutliche Zunahme der Insulinbindung. Nach ihren Ergebnissen verdrängt Proinsulin schon gebundenes Insulin nicht mehr vom Rezeptor, sondern schützt vielmehr das Insulin vor Verdrängung, was einer Verstärkung der Insulinwirkung gleichzusetzten wäre.

Frank und Veros (1968) berichten, daß Proinsulin am Rezeptor eine längere Verweildauer zeigt, als Insulin.

Angesichts der niedrigen Plasmakonzentrationen und der geringen biologischen Aktivität scheint bei derzeitigem wissenschaftlichen Stand noch ungewiß, welchen Einfluß die Anwesenheit von Proinsulin im Blut auf den Stoffwechsel ausübt.

Aus der Übersicht der Literatur ergeben sich unterschiedliche, teilweise widersprüchliche Ergebnisse, so daß über den Wirkungsmechanismus von Proinsulin noch keine völlige Klarheit besteht. Insbesondere fehlt eine übereinstimmende Aussage über die mögliche wechselseitige Beeinflussung von Insulin und Proinsulin in ihrer biologischen Wirkung, in ihrer Pharmakokinetik und Dynamik.

2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die biologische Aktivität von Human-Insulin- und Human-Pro-insulin, getrennt und in Kombination, beim Kaninchen untersucht.

Dazu wurden nach Belastung mit äquipotenten Dosen, sowohl die Resorption als auch die blutzuckersenkende Wirkung von Prohormon und Hormon im zeitlichen Profil bestimmt und bei verschiedenen Applikationsformen verglichen.

Es ergab sich folgende Fragestellung:

1. Wie unterscheidet sich die hypoglykämische Wirkung von Human-Insulin und Human-Proinsulin bei intravenöser, intraperitonealer und subcutaner Applikation?
2. Ergibt sich bei gemeinsamer Applikation von Human-Insulin und Human-Proinsulin eine additive, hypoglykämische Wirkung, oder potenziert sich die Human-Insulinwirkung durch Human-Proinsulin im Sinne einer intrinsic-Substanz?
3. Findet sich ein plausibler Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von Blutglucose und Human-Insulin bzw. Human-Proinsulin?

3. Versuchsplan

3.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 6-8 Wochen alte, männliche Kaninchen (Albino Neuseeländer, Firma Dr. Ivanovas GmbH Kisslegg, Allgäu) verwendet, die gesund und nicht vorbehandelt waren. Sie wurden in Einzelkäfigen gehalten und mit einer Standarddiät ernährt. (Kaninchen Standarddiät Firma Altromin.)

Über eine Tageshälfte wurde mit Neonlicht beleuchtet. Während des Versuchs schwankte das Körpergewicht zwischen 3000 und 3300 g. Die Bestimmung des Tagesgewichts war zur Herstellung der Injektionslösung von Bedeutung, deren Dosis sich immer auf kg/Körpergewicht bezog.

3.2. Äquipotente Dosen

In einem Vorversuch mit nicht markierten Substanzen, wurden mit drei Kaninchen (Wiener Mischlinge), für verschiedene Applikationsformen geeignete Dosen von Human-Insulin bzw. Human-Proinsulin gesucht. Sie sollten eine möglichst hohe blutzuckersenkende Wirkung garantieren, jedoch zu keiner Hypoglykämie führen, um einen unterschiedlich hohen Glucoseanstieg, als überschießende Gegenregulation, im Sinne eines Somogyi-Effekts, zu verhindern. Diese Tiere schieden für alle weiteren Versuche aus.

3.3. Applikationen

Die intravenöse und subcutane Injektion erfolgte, nachdem die Kaninchen in Plastikkästen gesetzt wurden, deren obere Begrenzung aus Stoff bestand und einen Bewegungsspielraum zuließ. In dieser Haltevorrichtung tolerierten die Tiere die Blutabnahme aus der Ohrvene gut und konnten während der Dauer des Versuchs ruhig gehalten werden.

Für die intraperitoneale Injektion wurde die Bauchdecke durch Festhalten der Extremitäten angespannt. Die spürbaren Unterschiede beim Durchtrennen der verschiedenen Gewebsschichten mit der Injektionsnadel, dienten als Kontrolle, in den Intraperitonealraum vorgedrungen zu sein.

3.4. Probenahme

Um die Ausgangswerte der Glucosekonzentration annähernd gleich zu halten, wurde besonderer Wert darauf gelegt, die Tiere keinem unnötigen Stress auszusetzen. Deshalb wurde, nach der Bestimmung des Tagesgewichts, kurze Zeit mit der Applikation der Versuchssubstanz gewartet.

Bei der Festlegung der Versuchsanordnung wurde darauf geachtet, einen einfachen Zugang zum venösen Blut der Kaninchen zu erhalten, um über die Versuchsdauer (maximal 4 Stunden) eine häufige Probenahme zu ermöglichen.

Da das venöse Blut aus der Ohrrendvene gewonnen wurde, war das Probevolumen, aus dem die Konzentrationen von Insulin bzw. Proinsulin sowie die Glucosekonzentration bestimmt werden sollten, möglichst gering zu halten.

Der Versuch, diese Vene mit einem Dauerkatheter über die Versuchszeit offen zu halten, gelang nicht. Für jede Probenahme mußte neu punktiert werden.

Serum und Plasma enthalten einen insulinspaltenden Faktor, der mit dem Grad der Hämolyse zunimmt und der wahrscheinlich aus den Erythrozyten stammt. Aus diesem Grund war eine vorsichtige Blutgewinnung notwendig (Breuer, H. et al., 1975).

Bei den unterschiedlichen Applikationsformen wurden die Intervalle der Probenahme sowohl dem Wirkungsmaximum als auch der Wirkungsdauer angepaßt (s. Anhang 1).

3.5. Behandlung der Proben

Das tropfenweise austretende Blut wurde in NaF-vorbeschichteten Röhrchen gesammelt und bis zur Analyse bei 2-8 C aufbewahrt. (Probevolumen ca. 1 ml). Für die radioimmunologische Insulinbestimmung wurden die Proben zentrifugiert und das Serum bei -20 C eingefroren.

4. Bestimmungsmethoden

4.1. Blutglucose

Die Bestimmung der Glucosekonzentration wurde mit dem Glucose-Analyser (GA Firma Yellow Springs Co., Mod. 23 A) durchgeführt, dessen Funktionsprinzip auf der enzymatischen Umwandlung von Glucose und Sauerstoff in Gluconsäure und Wasserstoffperoxid basiert. Das Enzym Glucoseoxidase ist zwischen zwei semipermeablen Membranen eingeschlossen. Diese Anordnung trennt die Meßelektrode von der Meßkammer.

In der Membran findet folgende Reaktion statt:



Bei der Oxidation von Glucose zu Gluconsäure wird gleichzeitig Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert.

Das instabile Peroxid wird mit Hilfe von Katalase, die in der Pufferlösung enthalten ist, in Wasserstoff und Sauerstoff übergeführt.



Die resultierende Sauerstoffspannung, die proportional zur Glucosekonzentration ist, wird mit der Silber-Platin- Sauerstoff-Elektrode in ein elektrisches Signal umgewandelt, das verstärkt, digitalisiert und von einem elektronischen Rechner verarbeitet wird. Das Meßgerät zeigt digital die Blutzuckerkonzentration in "mg/dl" an.

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden 25 µl unbehandeltes Vollblut mit einer Präzisionspipette in die Meßkammer des Glucose-Analysers injiziert. Bereits nach 30 Sekunden konnte die aktuelle Glucosekonzentration abgelesen werden.

Aus einer Blutprobe wurden jeweils drei Parallelwerte bestimmt.

Für den Mittelwert der Standardabweichung ergab sich:

SD = $\pm 0,2$ mg/dl (n=164)

Zu Beginn einer Meßreihe erfolgte die Eichung des Geräts mit einer Glucoselösung (Konzentration 200 mg/dl). Im Abstand von 20-30 Minuten wurde die Einstellung kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert.

4.2. Insulin und Proinsulin

Zur Messung der Insulinkonzentration wurden zwei Methoden angewandt. Einmal wurde über das Tracer-Prinzip die Konzentration jenes Insulins gemessen, das in radioaktiv markierter Form injiziert wurde und über die Aktivität neu erfaßt werden konnte. Um die Annahme zu bestätigen, daß die gemessene Radioaktivität in den Blutproben den Verlauf der Hormonkonzentration darstellt, wurde zusätzlich die Konzentration von Insulin radioimmunologisch bestimmt.

Mit Hilfe der immunologischen Methode war die Messung des Gesamtinsulins möglich, nachdem die Injektion derselben nicht markierten Insulindosis, wie bei der Tracer-Methode, vorausgegangen war. Sie wurde für die intravenöse, intraperitoneale und subcutane Insulin-Applikation durchgeführt.

4.2.1 Tracer-Methode

Die Tracer-Methode ermöglicht es, den Weg einer Substanz zu verfolgen, indem diese markiert, und später die Markierung als Meßgröße erfaßt wird. Als Tracer können z.B. Fluoreszenzstoffe oder, wie in dieser Arbeit, kleine Mengen radioaktiven Materials benützt werden.

Die biologischen und chemischen Eigenschaften von markierten und nicht markierten Substanzen müssen identisch sein. Bei Kenntnis der injizierten Gesamtaktivität und der Menge der nicht markierten Substanz, kann später in einer Blutprobe die Zählrate bestimmt und als Maß der resorbierten Substanzen verwendet werden (Breuer, H., 1975).

Für diesen Versuch wurden J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin (Firma Eli Lilly GmbH, Giessen) eingesetzt. Bei einer Halbwertszeit des J125 von 60 Tagen, konnten die markierten Substanzen über einen längeren Zeitraum verwendet werden. Die Impulsrate von J125 der standardisierten Proben wurde, in einem Energiefenster von 20-85 keV, in einem NaJ (TL)-Bohrloch-Detektor 10 Minuten gemessen. (Automatischer Gamma-Probenwechsler BF 5300 Firma Berthold, München)

Die Ermittlung des Untergrundes erfolgte in einer Langzeitmessung. Neben einer Vollblutprobe von einem unbehandelten Kaninchen wurde jeweils auch eine Probe gemessen, die nur 1,5 ml Natriumchlorid enthielt.

Die Zählraten dieser Proben zeigten von Tag zu Tag geringfügige Schwankungen, wichen aber unter Berücksichtigung der Zählstatistik nicht signifikant voneinander ab.

Der Mittelwert von 14 Proben, über einen Zeitraum von 3 Wochen gemessen, betrug: $\text{cpm}_0 = 62 \pm 3 \text{ cpm}$ ($n = 14$).

Da den Tieren, im Abstand von 3 Wochen, mehrfach Radiotracer appliziert wurde, mußte eine mögliche Kontamination aus vorhergegangenen Versuchen ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde vor Injektion der Substanz eine Kontrollprobe entnommen, deren Impulsrate aber immer im Schwankungsbereich des normalen Backgrounds lag. Daraus ist zu schließen, daß das radioaktive Jodatome der Tracersubstanz entweder vollständig in die Schilddrüse aufgenommen oder bereits über die Niere ausgeschieden wurde.

Die Aktivitätskonzentration (P) zu einer Zeit (T) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$P_T = n_P - n_0 \quad (\text{cpm}/0,5 \text{ ml})$$

wobei n_P : Bruttoimpulsrate der 0,5 ml Probe

n_0 : Nulleffektzählrate

4.2.2 Radioimmunoassay

Die quantitative Insulinbestimmung erfolgte im Immunoassay nach der "Isotopenverdünnungsmethode" nach Yalow und Berson.

Wenn man eine definierte Menge von markiertem Insulin mit einer definierten Menge von Insulinantikörper versetzt, bildet sich in einem bestimmten Verhältnis löslicher Insulinantikörper-Komplex, als lockere Verbindung, die noch dissoziiert. Setzt man anschließend nicht markiertes, kaltes Insulin oder insulinhaltiges Serum zu, so wird ein Teil des markierten Insulins aus dem Komplex verdrängt. Die markierte Verbindung wird also "verdünnt". Es wird um so mehr markiertes Insulin aus dem Insulin-Insulinantikörper-Komplex verdrängt, je mehr nicht markiertes Insulin zugesetzt wird.

Als nächstes muß der Insulin-Insulinantikörper-Komplex noch vom freien Insulin getrennt werden. In unserem Versuch erfolgte die Trennung des freien vom Antikörpergebundenen Insulin durch Filtration mit Glasfritten. Das Präzipitat wurde auf Filterpapier gesammelt, in Meßgefäße gelegt und anschließend die Impulsrate von J125 gezählt (Zählzeit 10 Minuten).

Bei den Bestimmungen müssen jeweils Eichkurven mit vorgegebenen Insulinkonzentrationen mitaufgezeichnet werden. Die Berechnung der Insulinkonzentration in $\mu\text{E/ml}$ aus der Zählrate von J125-Insulin erfolgte anhand der Eichkurve (Yalow, R. S., Berson S. A. 1960).

Mit Hilfe dieser Methode wurde das Insulin im Serum bestimmt. Pro Meßwert war 1 ml Vollblut notwendig. Aus den Seren wurden 0,2 ml für Parallelbestimmungen entnommen.

Dosierung, Applikation und Abnahme der Proben wurde analog zu den Versuchen mit markierten Substanzen durchgeführt.

Da die radioimmunologische Bestimmung erst nach Wochen durchgeführt werden konnte, wurden die Proben zentrifugiert und das Serum zur Untersuchung bei -20°C eingefroren.

Für Inkubation und Trennung wurden Reagenzien und Methoden der Firma Sorin, Zürich verwendet. (s. Anhang 2)

5. Herstellung und Kontrolle der radioaktiv markierten Substanzen

5.1 Herstellung der Substanzen

Radioaktives Material der Firma Eli Lilly, Giessen.

J125-Human-Insulin: Isotopenaktivität: 15-17 μCi
spez. Akt.: 348 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

J125-Human-Proinsulin: Isotopenaktivität: 14-19 μCi
spez. Akt.: 219,9 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$

(Die Peptidkonzentrationen konnten vernachlässigt werden.)

Biosynthetisches Human-Insulin: 40 IE/ml

Biosynthetisches Human-Proinsulin: 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Plasmaigel: 2%

Die markierten Substanzen wurden in getrockneter Form geliefert. Zur Weiterverwendung wurde das auskristallisierte, radioaktive Material mit Plasmaigel gelöst und der Inhalt in 10 Portionen aufgeteilt. (s. Anhang 3)

Pro Eppendorfgefäß: J125-H-Ins (1,5 - 1,7 μCi)
in 0,2 ml Plasmaigel
J125-H-Pro (1,4 - 1,9 μCi)
in 0,2 ml Plasmaigel

Bis zur Verwendung wurden die gelösten Substanzen bei -20°C gelagert. Wieder aufgetaute Substanzen wurden innerhalb eines Tages verbraucht.

Als Träger für J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin dienten die injizierten, nicht markierten Substanzen, in den Dosen, die für die verschiedenen Applikationsformen im Vorversuch ermittelt wurden.

Mit Plasmagel wurde bis zum Endvolumen von 1,0 ml aufgefüllt und nach sorgfältigem Mischen, 3 Proben zu je 10 µl, als Standard zur Festlegung der Gesamtempulsrate der Injektionslösung, entnommen.

Alle Volumina wurden mit verstellbaren Präzisionspipetten pipetiert. Die Lösungen kamen zu keiner Zeit mit Glas in Berührung. Insulin kann bei Verwendung von Glasinstrumenten in einem beträchtlichen Ausmaß absorbiert werden. Es empfiehlt sich, außer der Arbeit mit Kunststoffgeräten zusätzlich Plasmagel zu verwenden.

5.2. Kontrolle der radioaktiven Lösung

Um eine mögliche Dejodierung der Substanzen zu erkennen, wurde nach jedem Verdünnungsvorgang die Injektionslösung mit einer Kurzzeitelektrophorese kontrolliert.

Auf eine Acetatfolie wurden Injektionslösung (J125-Insulin bzw. J125-Proinsulin) und NaJ nebeneinander aufgetragen. Wegen der besseren Löslichkeit von Insulin und Proinsulin im alkalischen Medium wurde der Trennungsvorgang mit 0,06 mol Veronalpuffer pH 8,6, als Trägerflüssigkeit durchgeführt. Nach 30 Minuten Trennung (Trennkammer Firma Boskamp) und anschließendem Anfärben, konnten alle Fraktionen auf dem Cellulosestreifen sichtbar gemacht werden.

Da es sich bei den radioaktiven Produkten um großmolekulare Polypeptide mit geringer Wanderungsgeschwindigkeit handelte, konnten sie eindeutig vom rasch wandernden Jodid abgetrennt werden.

Relative Wanderungsgeschwindigkeit:

Human Insulin : 0,15 Jodid : 0,72

Human Proinsulin: 0,14 Jodid : 0,72

Nach dem Trocknen wurde die Acetatfolie in 3 Fraktionen geteilt und deren Impulsrate bestimmt.

Für J125-Human-Insulin bzw. J125-Human-Proinsulin wurden am Start ca. 10000 cpm aufgetragen. Ein großer Teil der Aktivität sollte in der Höhe der Insulin- bzw. Proinsulinbande wiedergefunden werden.

Bei Abspaltung des J125 von Insulin bzw. Proinsulin hätte sich ein Teil der Aktivität in Höhe der Jodidbande gezeigt.

Fraktion 1	H-Ins bzw. H-Pro	ca. 6000 cpm
Fraktion 2	Zwischenbande	ca. 80 cpm
Fraktion 3	Jodidbande	ca. 80 cpm

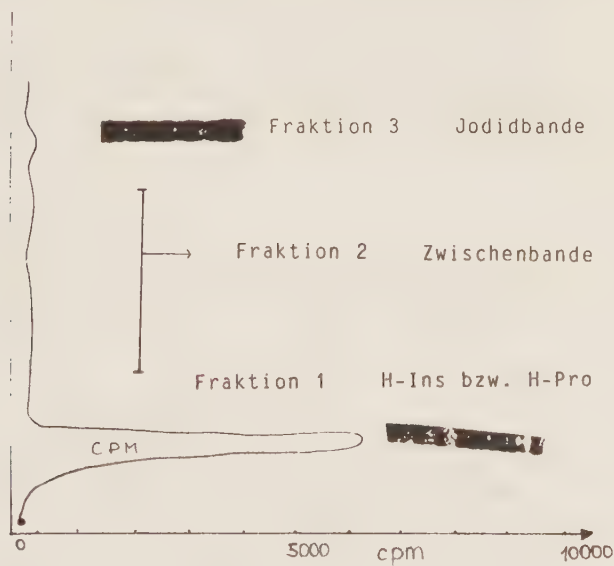


Abb.5 Acetatfolie nach der Färbung.: Insulin bzw. Proinsulin läßt sich eindeutig vom Jod abtrennen.

6. Darstellung der Ergebnisse

Im venösen Kaninchenblut wurden, nach Injektion der radioaktiv markierten Substanzen, gleichzeitig bestimmt:

Glucosekonzentration (mg/dl),

Konzentration von J125-Human-Insulin bzw.
J125-Human-Proinsulin (cpm/ml)

und der Konzentrationsverlauf im folgenden graphisch dargestellt.

Um die blutzuckersenkende Wirkung der verschiedenen Substanzen untereinander vergleichen zu können, wurden alle Meßergebnisse auf den Mittelwert der Glucose, vor Beginn der Injektion, bezogen.

BG $124,7 \pm 4,5$ mg/dl (n=54)

Die Impulsraten von J125, als Maß der Hormonkonzentrationen, wurden auf den Mittelwert der Gesamtimpulszahl der Injektionslösung normiert.

cpm = $7,2 \times 10^5$ cpm/ml + $0,6 \times 10^5$ (n=54)

In der Folge wurden Blutglucose und Impulsrate, für die jeweiligen Substanzen und Applikationsformen, einzeln dargestellt.

Aus Übersichtlichkeitsgründen sind im zweiten Teil nur die blutzuckersenkenden Wirkungen untereinander verglichen. Für die einzelnen Applikationsformen wurden alle Substanzen, und für die jeweiligen Substanzen die Applikationsformen, in einer Kurve graphisch dargestellt.

6.1. Injektion von J125-Human-Insulin

6.1.1 Intravenöse Injektion von J125-Human-Insulin

Die intravenöse Injektion von $5,6 \mu\text{g/kgKG}$ Human-Insulin bewirkte bereits nach 5 Minuten eine signifikante Blutzuckersenkung. Nach 20 Minuten wurde die niedrigste Glucosekonzentration, 49% der Ausgangsglucose, gemessen; bei einer maximalen Glucosedifferenz von $66,2 \text{ mg/dl}$. Daraus ergibt sich eine maximale Senkung pro μg Human-Insulin um $11,8 \text{ mg/dl}$. In der Erholungsphase stieg die Glucose nach 60 Minuten auf 79%, nach 120 Minuten auf 90% des Ausgangswertes.

Die Impulsrate des resorbierten J125-Human-Insulins war in der ersten Blutprobe nach 5 Minuten am größten. Nach 20 Minuten, dem Zeitpunkt der niedrigsten Glucosekonzentration, waren noch 55% der Höchststrafe zu messen, die sich auch, mit Ausnahme geringer Schwankungen, bis zum 2-Stundenwert nicht deutlich senkte.

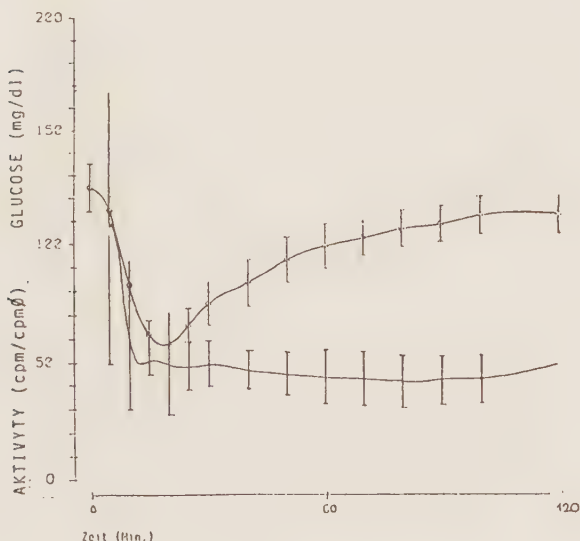


Abb. 6 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Insulin (cpm/ml) nach intravenöser Injektion.

6.1.2 Intraperitoneale Injektion von J125-Human-Insulin

Bei der intraperitonealen Belastung mit 5,6 $\mu\text{g/kgKG}$ Human-Insulin begann die Glucosesenkung verzögert, nachdem die ersten Proben nach 5 Minuten sogar einen geringen Blutzuckeranstieg zeigten. Wahrscheinlich war diese Blutzuckererhöhung auf den Stress der Tiere zurückzuführen, dem sie durch die Haltemaßnahmen bei der intraperitonealen Injektion ausgesetzt waren. Der niedrigste Glucosewert, 75% der Ausgangskonzentration, wurde nach 40 Minuten erreicht. Dies entspricht einer maximalen Glucosesenkung um 33,0 mg/dl und einer Senkung von 5,89 mg/dl pro μg Human Insulin.

In der Blutprobe nach 10 Minuten, war eine niedrige Impulszahl zu messen, die, bis zum 40-Minutenwert, kontinuierlich anstieg. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung nach weiteren Zeitabschnitten waren Schwankungen unterworfen, die keine Aussage über das Verhalten der Radioaktivität zuließen.

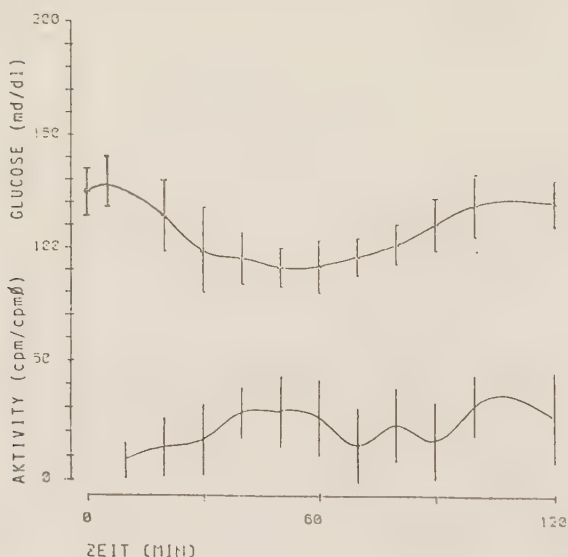


Abb.7 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Pulsrate von von J125-Human-Insulin (cpm/ml) nach intraperitonealer Injektion.

6.1.3 Subcutane Injektion von J125-Human-Insulin

Bei subcutaner Injektion von $11,2 \mu\text{g/kgKG}$ Human-Insulin war nach 10 Minuten eine hypoglykämische Wirkung zu erkennen. Das Wirkungsmaximum wurde mit einer zeitlichen Streuung zwischen 60 und 80 Minuten erreicht. Der niedrigste Glucosewert, 56% der Ausgangsglucose, wurde über 20 Minuten beibehalten oder nur unerheblich verändert. Die maximale Glucosedifferenz ergab $54,4 \text{ mg/dl}$ bzw. $4,87 \text{ mg/dl}$ pro μg Human-Insulin.

Die Aktivität des resorbierten J125-Human-Insulins stieg nur sehr zögernd. Die Impulsrate des 10-Minutenwertes war nach 50 Minuten annähernd verdreifacht und erhöhte sich bis zum 160-Minutenwert unwesentlich. Dann zeigte sich über eine weitere Stunde eine rückläufige Tendenz.

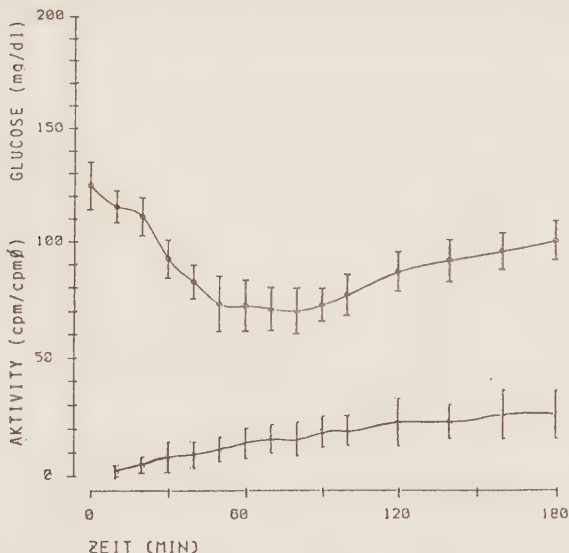


Abb.8 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Insulin (cpm/ml) nach subcutaner Injektion.

6.2. Injektion von J125-Human-Proinsulin

6.2.1 Intravenöse Injektion von J125 Human-Proinsulin

Bereits 5 Minuten nach Injektion von 42 $\mu\text{g/kgKG}$ war eine blutzuckersenkende Wirkung zu erkennen. Das Wirkungsmaximum nach 25 Minuten, zeigte noch 52% der Ausgangsglucose. Es ergab sich eine maximale Glucose-senkung um 56,4 mg/dl bei einer Senkung von 1,34 mg/dl pro μg Proinsulin.

Die Erholungsphase zeigte einen verzögerten Anstieg. Nach 60 Minuten waren 62%, nach 120 Minuten 75% und nach 180 Minuten 88% der Ausgangsglucose wieder erreicht.

Erwartungsgemäß war die Impulszahl von J125-Human-Proinsulin nach 5 Minuten am höchsten. In den folgenden 5 Minuten war eine rasche Impulsabnahme zu erkennen, die bis zum 20-Minutenwert anhielt. Der spätere Aktivitätsabfall blieb unbedeutend.

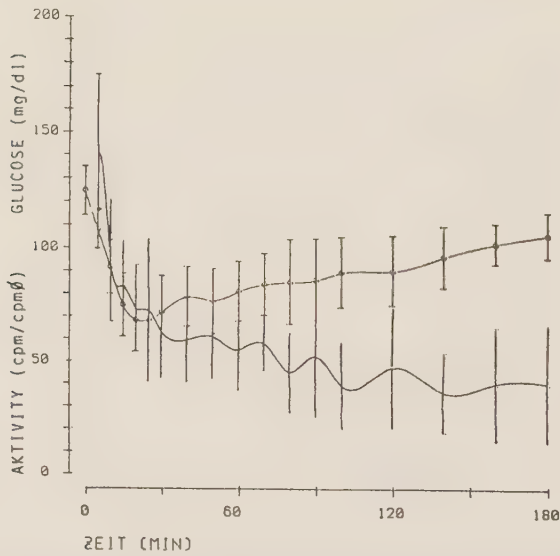


Abb.9 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Proinsulin (cpm/ml) nach intravenöser Injektion.

6.2.2 Intraperitoneale Injektion von J125-Human-Pro-insulin

Bei der intraperitonealen Injektion von 42 $\mu\text{g/kgKG}$ Human-Proinsulin war ein Wirkungsbeginn nach 5 Minuten, das Wirkungsmaximum nach 50 Minuten zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt waren noch 65% der Ausgangsglucose zu messen. Die maximale Glucosesenkung ergab 49,7 mg/dl, bei einer Senkung von 1,18 mg/dl pro μg Human-Proinsulin. Dieser Glucosewert wurde über 50 Minuten mit geringen Schwankungen beibehalten und erst nach 110 Minuten die Erholungsphase eingeleitet. Bis zum Versuchsende, nach 180 Minuten, wurden 83% der Ausgangsglucose wieder erreicht.

Bis zur 50. Minute stieg die Impulsrate von J125-Human-Proinsulin langsam an. Nach 50 Minuten, zum Zeitpunkt der niedrigsten Glucosekonzentration, war die Aktivität am höchsten. Bis zum Versuchsende, nach 180 Minuten, war eine langsame Impulsabnahme festzustellen.

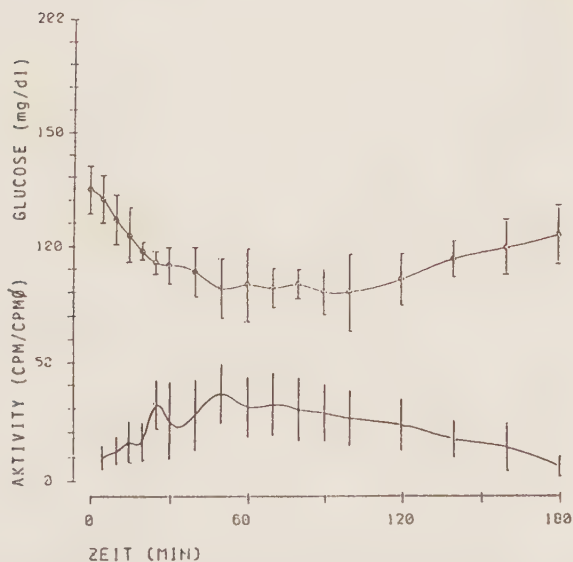


Abb.10 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Proinsulin nach intraperitonealer Injektion.

6.2.3 Subcutane Injektion von J125-Human-Proinsulin

Für die subcutane Injektion wurde die Dosis der Injektionslösung verdoppelt. Die hypoglykämische Wirkung von 84 $\mu\text{g/kgKG}$ Human-Proinsulin begann nach 20 Minuten. Im Wirkungsmaximum, nach 90 Minuten, waren noch 63% der Ausgangsglucose vorhanden, bei einer maximalen Blutzuckerdiffferenz von 45 mg/dl bzw. einer maximalen Glucosesenkung von 0,53 mg/dl pro μg Human-Proinsulin. Nach der Erholungsphase, die eine gleichmäßige Blutzuckererhöhung bis zur 240. Minute zeigte, wurden wieder 83% der Ausgangsglucose erreicht.

Die niedrigen Impulsraten der ersten Blutproben nach 10 Minuten stiegen bis zur 80. Minute gleichmäßig an und wurden dann bis zur 120. Minute beibehalten. Nach 180 Minuten zeigte sich ein erneuter Anstieg bis zum Versuchsende nach 240 Minuten.

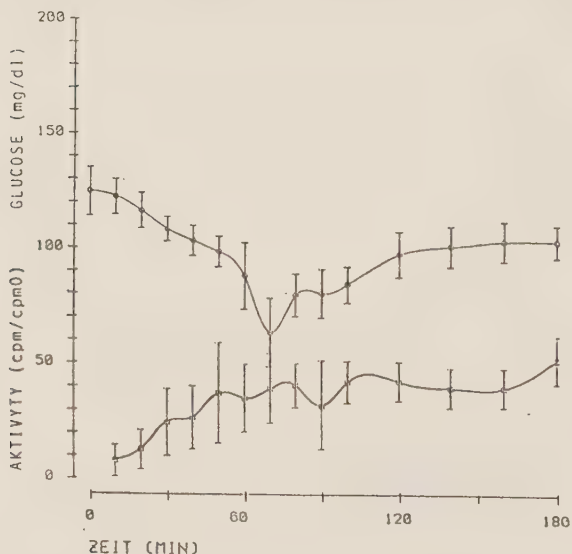


Abb.11 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Proinsulin (cpm/ml) nach subcutaner Injektion.

6.3. Injektion von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin

6.3.1 Intravenöse Injektion von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin

Die erste blutzuckersenkende Wirkung von 2,8 µg Human-Insulin und 21 µg Human-Proinsulin/kgKG, gemeinsam appliziert, zeigte sich bereits bei den Blutproben nach 5 Minuten. Im Wirkungsmaximum, das nach 25 Minuten vorlag, waren 44% des Ausgangsglucosewertes zu messen. Dies entsprach einer maximalen Glucosesenkung von 70,0 mg/dl. (Bei kombinierter Injektion ließ sich keine maximale Blutzuckersenkung pro µg Substanz errechnen.) Die gleichmäßig verlaufende Erholungsphase, ließ, nach 180 Minuten, eine Glucoseerhöhung auf 83% der Ausgangskonzentration zu.

Die Aktivität von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin war in den ersten Proben, nach 5 Minuten, am größten und nahm zum Versuchsende, nach 180 Minuten, langsam ab. Zu diesem Zeitpunkt waren noch 45% der Höchstaktivität vorhanden.

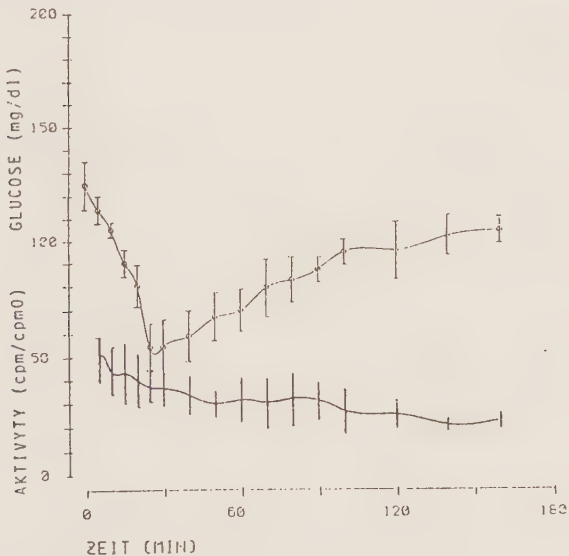


Abb.12 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin nach intravenöser Injektion.

6.3.2 Intraperitoneale Injektion von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin

10 Minuten nach intraperitonealer Belastung mit $2,8 \mu\text{g}$ Human-Insulin und $21 \mu\text{g}$ Human-Proinsulin, gemeinsam appliziert, trat eine geringe, hypoglykämische Wirkung auf. Das Wirkungsmaximum zeigte sich nach 40 Minuten. Die Blutglucose lag jetzt bei 64% des Ausgangswertes, mit einer maximalen Senkung um $45,7 \text{ mg/dl}$. Am Ende der Erholungsphase, nach 180 Minuten, waren 89% der Ausgangs-glucose erreicht.

Über die gesamte Versuchsdauer war eine sehr geringe Impulsrate zu messen. Sie stieg bis zur 100. Minute an, blieb über 20 Minuten annähernd konstant und erniedrigte sich bis zur 180. Minute nur zögernd.

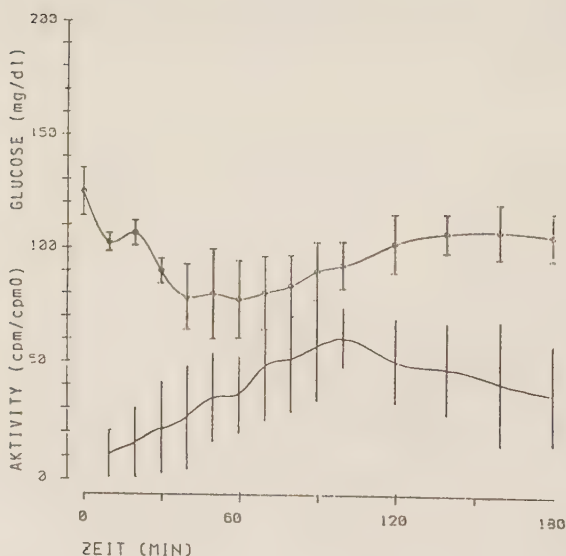


Abb.13 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin nach intraperitonealer Injektion.

6.3.3 Subcutane Injektion von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin

Nach subcutaner Belastung mit 5,6 μg Human-Insulin und 21 μg Human-Proinsulin pro kgKG war die erste Glucose-erniedrigung nach 20 Minuten ersichtlich. Das Wirkungsmaximum lag nach 80 Minuten bei 53% der Ausgangsglucose, mit einer maximalen Glucosedifferenz von 55,2 mg/dl. Nach einem kontinuierlichen Blutglucoseanstieg waren, nach 240 Minuten, wieder 85% der Ausgangsglucose erreicht.

Die Aktivität von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin war nach 10 Minuten mit einer geringen Impulsrate meßbar, stieg bis zum 80-Minutenwert an und wurde anschließend 20 Minuten beibehalten. Vom 120-Minutenwert stieg die Aktivität erneut bis 180 Minuten an und fiel dann bis zum Versuchsende nach 240 Minuten geringfügig ab.

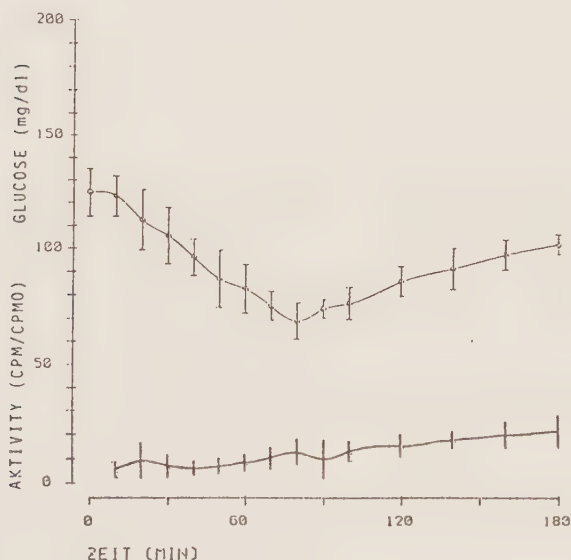


Abb.14 Verlauf von Blutglucose (mg/dl) und Impulsrate von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin nach subcutaner Injektion.

6.4 Vergleichende Darstellung der Ergebnisse

Beim Kaninchen zeigte Human-Proinsulin, bezogen auf das Substanzgewicht, eine vergleichbare maximale Glucose-senkung nach intravenöser und intraperitonealer Applikation. Bei diesen Injektionsformen garantierten 42 µg/kgKG Human-Proinsulin ein Wirkungsmaximum mit einer maximalen Glucosesenkung von 56,4 mg/dl, bei intravenöser bzw. 49,7 mg/dl bei intraperitonealer Applikation. Eine Hypoglykämie, mit nachfolgender überschießender Gegenregulation der Blutglucose, im Sinne eines Somogyi-Effekts, konnte ausgeschlossen werden.

Um eine vergleichbare maximale Blutzuckerdifferenz zu erreichen, mußte bei subcutaner Injektion die Dosis verdoppelt werden.

Human-Proinsulin	IV	IP	SC
Dosis in µg/kgKG	42,0	42,0	84,0
Δ BG max in mg/dl	56,4	49,7	45,0
Δ BG max/µg H-Pro	1,34	1,18	0,56

Dabei ergaben sich bei verschiedenen Applikationsformen nicht nur Unterschiede in der biologischen Aktivität, die an der hypoglykämischen Wirkung gemessen wurde; auch das zeitliche Profil des Blutzuckerverlaufs konnte, für jede Applikationsform, unterschiedlich charakterisiert werden (s. Abb 15).

Bei intravenöser Applikation erschien das Wirkungsmaximum nach 20 Minuten, während es bei intraperitonealer Injektion nach 50 und bei subcutaner Injektion erst nach 90 Minuten auftrat.

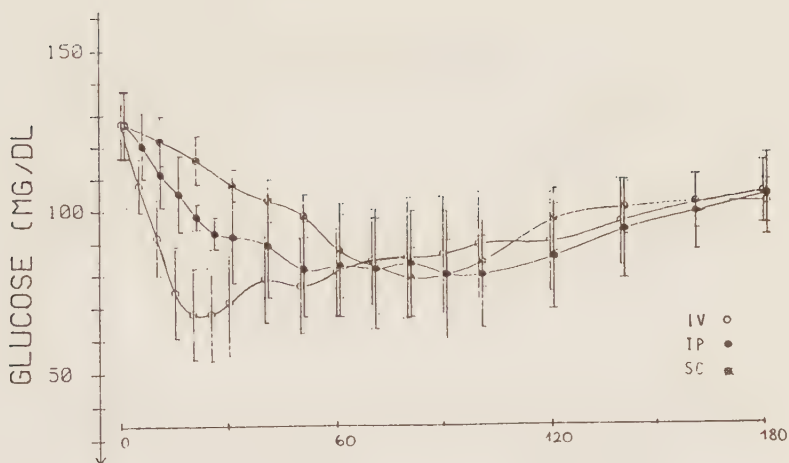


Abb.15 Vergleich der hypoglykämischen Wirkung von Human-Proinsulin nach intravenöser, intraperitonealer und subcutaner Injektion.

Im Gegensatz zur unterschiedlichen Sofortwirkung zeigte die Langzeitwirkung keine signifikanten Unterschiede.

Neben der maximalen Glucosesenkung der oben beschriebenen Dosen, wurde auch deren gesamt-hypoglykämische Wirkung bestimmt.

Als Maß für die integrale Blutzuckersenkung konnten die Gewichte der Dreiecke untereinander verglichen werden, deren Flächen gebildet wurden aus dem Mittelwert der Blutglucose zu Versuchsbeginn, dem niedrigsten Blutzuckerwert im Wirkungsmaximum und dem Glucosewert nach Ende der Erholungsphase.

Bezogen auf die Gesamtglucose schien Human-Proinsulin, bei der intravenösen und subcutanen Applikation annähernd wirkungsgleich, während im Vergleich dazu, die Gesamtwirkung bei der intraperitonealen Injektion stark vermindert war.

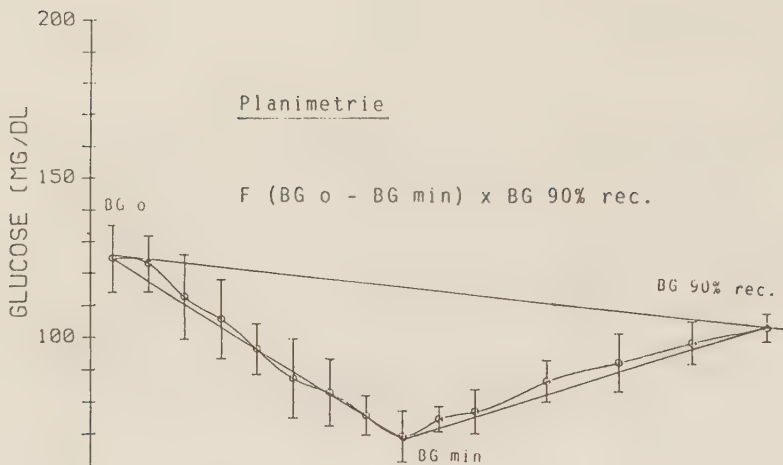


Abb.16 Als Maß für die integrale Blutzuckersenkung wurden die Flächen der Dreiecke verglichen, die gebildet wurden aus dem Mittelwert der Ausgangsglucose, dem Glucosewert bei maximaler Senkung und dem Wert am Ende der Erholungsphase.

Flächen der Dreiecke:

Flächen in g	IV	IP	SC
H-Ins	0,137	0,061	0,203
H-Pr0	0,203	0,135	0,183
H-Ins+H-Pro	0,204	0,134	0,192

Bezogen auf die Gesamtglucosesenkung schien Human-Proinsulin, in den angewandten Dosen, bei intravenöser und subcutaner Applikation annähernd wirkungsgleich, während die Gesamtwirkung bei der intraperitonealen Injektion stark vermindert war.

Im Vergleich zu Human-Insulin zeigte Human-Proinsulin nach subcutaner Injektionsform, eine annähernd gleichgroße, hypoglykämische Wirkung, während sich die Gesamtwirkung von Human-Proinsulin nach intravenöser und intraperitonealer Injektion verdoppelte.

Eine Erklärung dafür liegt in der veränderte Langzeitwirkung von Human-Proinsulin, die, im Gegensatz zur Human-Insulinwirkung, unabhängig von der Applikationsform, über 180 Minuten hinaus geht.

Vergleicht man die blutzuckersenkende Wirkung pro μg Substanzgewicht, so zeigte Human-Proinsulin je nach Applikation 11-20 % der biologischen Aktivität von Human-Insulin.

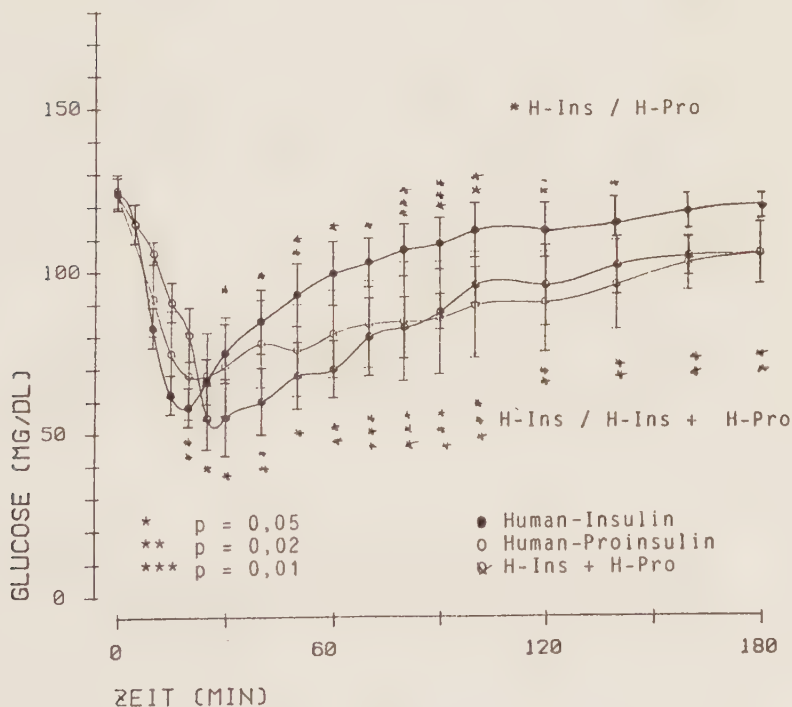


Abb.17 Vergleich der hypoglykämischen Wirkung von Human-Insulin, Human-Proinsulin und der Kombination von Human-Insulin und Human-Proinsulin nach intravenöser Injektion.

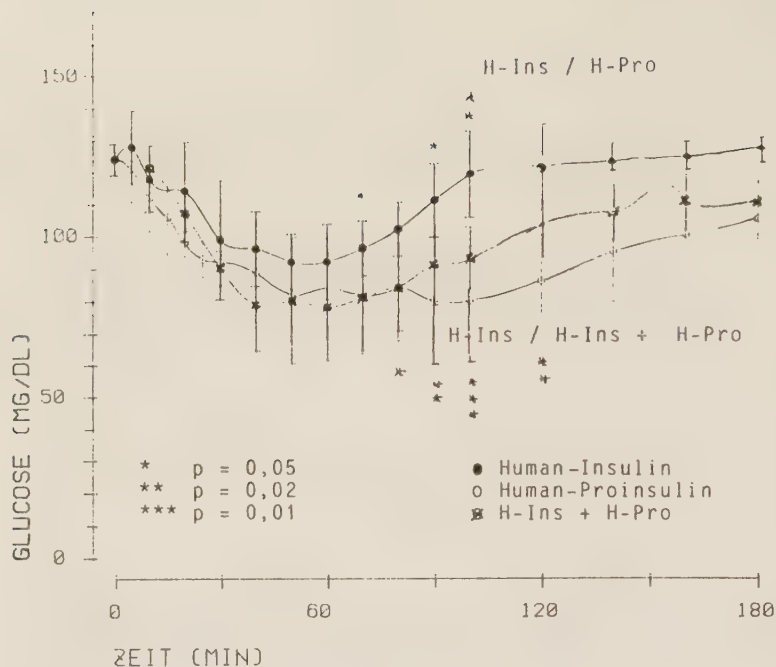


Abb.18 Vergleich der hypoglykämischen Wirkung von Human-Insulin, Human-Proinsulin und der Kombination von Human-Insulin und Human-Proinsulin nach intraperitonealer Injektion.

Bei den verschiedenen Applikationsformen ließ Human-Proinsulin, eine dem Human-Insulin ähnliche Sofortwirkung erkennen, mit einer geringen zeitlichen Verschiebung von Wirkungseintritt und Wirkungsmaximum. Unabhängig von den Applikationsformen reichte die Langzeitwirkung von Human-Proinsulin über 180 Minuten hinaus.

Injizierte man jeweils die Hälfte der annähernd wirkungsgleichen Substanzmenge von Human-Insulin und Human-Proinsulin gemeinsam, so addierte sich, unabhängig von der Applikationsform, deren hypoglykämische Wirkung. (Dieser Vergleich beruht auf einer linearen Dosis-Wirkungsbeziehung, die in Wirklichkeit nur in kleinen Bereichen möglich ist.)

Eine Potenzierung der Insulinwirkung durch Proinsulin, im Sinne einer intrinsic-Substanz konnte ausgeschlossen werden.

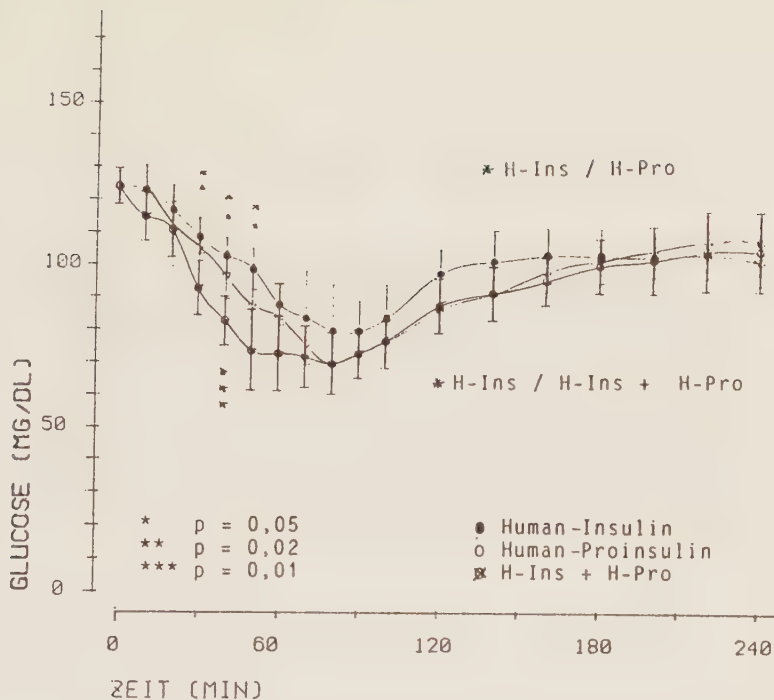


Abb.19 Vergleich der hypoglykämischen Wirkung von Human-Insulin, Human-Proinsulin und der Kombination von Human-Insulin und Human-Proinsulin nach subcutaner Injektion.

Resorption von J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin

Der Konzentrationsverlauf von J125-Human-Insulin wurde sowohl nach der Tracer-Methode bestimmt, die nur das radioaktiv markierte, resorbierte Human-Insulin erfaßte, als auch über den Radioimmunoassay, der die Konzentrationen von Kaninchen-Insulin und resorbiertem Human-Insulin gemeinsam aufzeichnete.

Nach intravenöser Applikationsform verlief, in den ersten 60 Minuten, die Aktivitätskurve von J125 parallel zum zeitlichen Profil der Insulinkonzentration, die radioimmunologisch bestimmt wurde. Wir konnten annehmen, daß die gemessene Radioaktivität den Verlauf der Hormonkonzentration darstellte (Abb. 20).

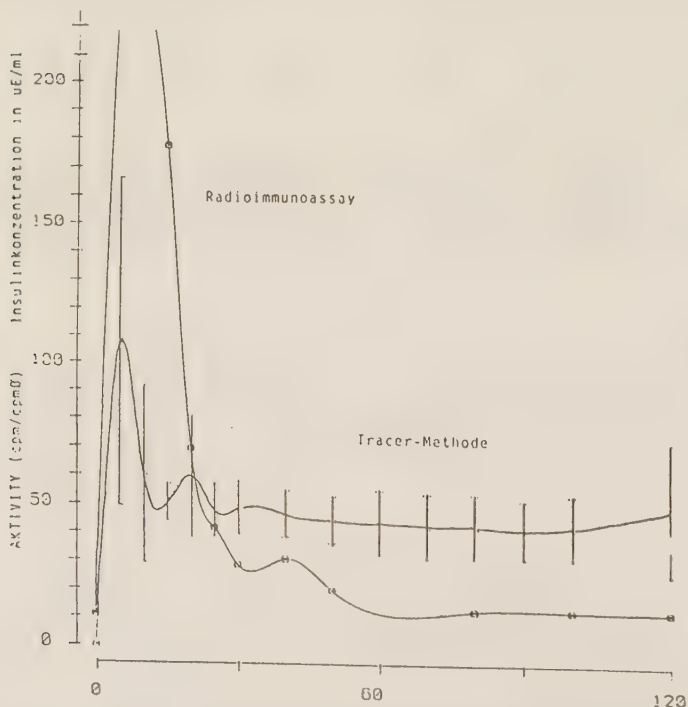


Abb.20 Vergleich der radioimmunologisch bestimmten Insulinkonzentration und der Aktivitätskurve von J125 nach intravenöser Applikation.

Es fand sich eine zeitliche Korrelation zwischen Hormon- und Glucosekonzentration, welche die gemessene Blutzuckersenkung plausibel erklärte.

Bei intraperitonealer und subcutaner Applikation von radioaktiv markiertem Human-Insulin, gelang es nicht, einen übereinstimmenden Kurvenverlauf von Impulsrate (als Maß der Human-Insulinkonzentration) und radioimmunologisch bestimmter Insulinkonzentration herzustellen. Diese unterschiedlichen Ergebnisse ließen keine Aussage über die Konzentration des resorbierten Hormons zu. Weiter fehlte ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Radioaktivitätskurve und dem Konzentrationsverlauf der Blutglucose. Wir mußten daher annehmen, daß zum Zeitpunkt der maximalen hypoglykämischen Wirkung J125 bereits von Human-Insulin bzw. Human-Proinsulin abgespalten worden war.

Einen Ausweg aus dieser Situation bietet möglicherweise eine immunologische Bestimmung von Human-Insulin und Human-Proinsulin, die für diese Versuche jedoch nicht zur Verfügung stand, da die Antikörper aus dem RIA-kit vom Kaninchen stammten.

7. Zusammenfassung

Nachdem neben Human-Insulin auch Human-Pro-insulin gentechnologisch hergestellt werden kann, sind vergleichende Untersuchungen zur biologischen Aktivität und zur Resorption von Hormon und Prohormon möglich geworden.

Dazu wurden gesunden und nicht vorbehandelten Kaninchen J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin getrennt und in kombinierter Form injiziert.

Die blutzuckersenkende Wirkung und die Bestimmung der Radioaktivität, als Maß der Hormonkonzentration, wurde sowohl bei getrennter, als auch bei kombinierter Injektion, nach intravenöser, intraperitonealer und subcutaner Applikation verglichen.

Bezogen auf die maximale Glucosesenkung waren folgende Dosen annähernd wirkungsgleich:

(1 IE Insulin = 40 μ g)

Appl.	Dosis (μ g/kgKG)	max. Δ BG (mg/dl)
-------	-----------------------	--------------------------

Human-Insulin

IV	5,6 (0,125 IE)	66,2
IP	5,6 (0,125 IE)	33,0
SC	11,2 (0,250 IE)	54,4

Human-Proinsulin

IV	42,0	56,4
IP	42,0	49,7
SC	84,0	45,0

Beim Kaninchen hatte Human-Proinsulin, bei den verschiedenen Applikationsformen eine signifikant unterschiedliche Sofortwirkung bis zur 60. Minute, danach waren keine signifikanten Unterschiede meßbar.

Human-Proinsulin zeigte eine, dem Insulin vergleichbare Sofortwirkung, danach eine Langzeitwirkung über 180 Minuten.

Gemessen an der maximalen Blutzuckersenkung hatte Human-Proinsulin, bezogen auf das Substanzgewicht, bei intravenöser und subcutaner Applikation ca. 11%, bei intraperitonealer Applikation ca. 20% der biologischen Aktivität von Human-Insulin.

Bei kombinierter Injektion wirkungsgleicher Dosen von Human-Insulin und Human-Proinsulin addierte sich deren blutzuckersenkende Wirkung.

Human-Proinsulin zeigte eine blutzuckersenkende Wirkung, vergleichbar einer Mischung aus Alt- und Langzeitinsulin. Ob dies beim Menschen zu einem therapeutischen Prinzip ausgebaut werden kann, bleibt weiteren Entwicklungen vorbehalten.

Diskussion

In der Literatur wird bisher die biologische Aktivität von Proinsulin unterschiedlich beurteilt.

Nach unseren Ergebnissen, liegt die biologische Wirksamkeit von Human-Proinsulin zwischen 11 und 20% der biologischen Aktivität von Human-Insulin. Gemessen wurde sowohl die maximale Glucosesenkung wie auch die gesamt-hypoglykämische Wirkung bei gesunden und nicht vorbehandelten Kaninchen.

Diese Befunde stimmen annähernd mit früheren Untersuchungen von Rinder-Proinsulin an Maus, Ratte, Schwein, Affe und Mensch überein, bei denen eine biologische Aktivität gefunden wurde, die zwischen 10 und 30% der Insulinaktivität lag. (Chance et al., 1968, Lazarus et al., 1970, Puls und Kroneberg, 1969, Galloway und Fineberg 1971).

Schatz et al., fanden 1984 eine relativ hohe Human-Proinsulin Aktivität beim Kaninchen, die nach intravenöser Applikation, bezogen auf die Substanzeinwage, ca. 65-70% der hypoglykämischen Insulinwirkung zeigte.

Wir konnten, bezogen auf das hypoglykämische Wirkungsmaximum, 5,6 µg/kgKG Human-Insulin und 42 µg/kgKG Human-Proinsulin bei intravenöser und intraperitonealer Injektionsform, sowie 12 µg/kgKG und 84 µg/kgKG bei subcutaner Applikation, als annähernd wirkungsgleich ermitteln.

Stoll et al. (1972), berichten über äquipotente Dosen, nämlich, 6 µg/kgKG Rinder-Proinsulin und 44 µg/kgKG Rinder-Insulin, nach Vergleich der hypoglykämischen Wirkung bei Pavian und Meerschweinchen.

Weiter fanden Puls et al. (1974), daß bei Ratte und Maus 4 µg/kgKG Rinder-Insulin und 16 µg/kgKG Rinder-Proinsulin die Blutglucose gleich stark senkten.

Nach unseren Ergebnissen läßt eine intravenöse Human-Proinsulin Injektion beim Kaninchen, eine dem Human-Insulin vergleichbare Sofortwirkung erkennen. Zudem trat eine Langzeitwirkung von 3 Stunden auf, mit entsprechend verzögertem Blutzuckeranstieg.

Schatz et al. (1984), berichten über ein zeitliches Wirkungsmaximum nach intravenöser Applikation von Human-Proinsulin beim Kaninchen, das nach 20-25 Minuten

erreicht wird und somit mit unseren Ergebnissen übereinstimmt. Unterschiedlich erscheint bei diesen Untersuchungen jedoch die verkürzte Langzeitwirkung, mit einem Blutzuckeranstieg, der rascher erfolgte, als nach Human-Insulin.

In unseren Versuchen stellte sich bei intraperitonealer Injektion von Human-Proinsulin, im Vergleich zur intravenösen Applikation, erwartungsgemäß das Wirkungsmaximum verzögert ein. Bei beiden Applikationsformen zeigte die Sofortwirkung von Human-Proinsulin, im Vergleich zu Human-Insulin, keine signifikanten Unterschiede. Jedoch war bei Proinsulin eine Langzeitwirkung über 4 Stunden hinaus zu erkennen.

Da die intraperitoneale Applikationsform für die Tiere offensichtlich mit besonderem Stress verbunden war, erhöhte sich die Blutglucosekonzentration, 5 Minuten nach Human-Insulin Gabe, obwohl zu diesem Zeitpunkt bereits eine hypoglykämische Wirkung zu erwarten gewesen wäre.

Bei denselben Kaninchen wurde nach 3 Wochen die intraperitoneale Human-Proinsulin Injektion und später auch die kombinierte Injektion von Human-Insulin und Human-Proinsulin durchgeführt. Anscheinend hatten sich die Tiere an die Stresssituation durch die notwendigen Haltemaßnahmen bei dieser Applikationsform gewöhnt, denn die anfängliche Blutglucoseerhöhung war jetzt nicht wieder aufgetreten.

Bei subcutaner Injektion fanden wir bei Human-Proinsulin das Wirkungsmaximum nach 80 Minuten. Die Langzeitwirkung über 4 Stunden ergab keine signifikanten Unterschiede zur Human-Insulinwirkung.

Schatz et al. (1984), berichten ebenfalls über ein Wirkungsmaximum, das bei subcutaner Injektion von Human-Proinsulin nach 90 Minuten auftrat.

Weiter fanden Kirsch et al. (1984), nach subcutaner Injektion von Human-Insulin bei Ratten, eine maximale Glucosesenkung nach einer Stunde, bei Human-Proinsulin-Injektion jedoch nach 2 Stunden, wobei hier, im Wirkungsmaximum über ca. 30 Minuten, die Blutglucose konstant erniedrigt blieb. Sie berichten ebenfalls über eine verzögerte Erholungsphase nach Human-Proinsulin-Applikation. Während 3 Stunden nach Human-Insulin-Injektion der Anstieg der Blutglucose bereits beendet war, zeigte sich zum selben Zeitpunkt, nach Human-Proinsulin-Injektion, nur ein ganz geringer Glucosanstieg, der erst nach 5 Stunden zur Ausgangsglucosekonzentration zurückführte.

Anhang:1 Intervalle der Probenahme

Appl.	Zeit (Min)	Zeitabstand (Min)
IV	0 - 30	5
	30 - 60	10
	60 - 120	20
IP	0 - 100	10
	100 - 180	20
SC	0 - 100	10
	100 - 240	20

Bei der intravenösen Injektion war das Wirkungsmaximum bereits nach 20-30 Minuten zu erwarten. Aus diesem Grund wurden die Intervalle der Probenahme dicht aneinander gelegt und die Proben anfangs alle 5 später alle 10 Minuten entnommen.

Für die intraperitoneale und subcutane Injektion wurde die Versuchsdauer auf 3 bzw. 4 Stunden verlängert. Die Probenahme wurde für die erste Stunde im Abstand von 10 Minuten, dann alle 20 Minuten durchgeführt.

Anhang: 2 Radioimmunassay

Herstellung der Standardproben durch Verdünnung mit Phosphatpuffer:

Standard	6	200 μ E
	5	100 μ E
	4	50 μ E
	3	25 μ E
	2	10 μ E
	1	5 μ E

Die Impulsrate der bekannten μ E Insulin wird auf halblogarithmischem Papier, in Abhängigkeit von der tatsächlich eingesetzten Aktivität, aufgetragen. Aus dieser Eichkurve kann aus der Zählrate der Proben deren Aktivität entnommen werden.

Je niedriger die Aktivität der einzelnen Proben, desto höher der Anteil an nicht markiertem Seruminulin aus den Meßproben.

Berechnung der Eichkurven:

Fehler 0,024

Näherung: Extrema 0 Wendepunkt 1

Kontrollquotient 0,23

S 1,00

Probenansatz in 2 ml-Eppendorf-Gefäßen . Vol: μ l

Reagenzien	Ges. Akt.	0-Wert	1 - 6 Stand.	Probe
Puffer	---	100	---	---
Standards	---	---	100	---
Serum	---	---	---	100
Bind.Reagenz.	---	100	100	100

Inkubation: 6 Stunden bei 2-8°C

J125-Ins	---	100	100	100
----------	-----	-----	-----	-----

Inkubation: 18 Stunden bei 2-8°C

Die Trennung des freien, vom antikörpergebundenen Insulins, erfolgte durch Filtration mit Glasfritten.

Das Präzipitat wurde auf Filterpapier gesammelt, in Meßgefäße gelegt und anschließend die Impulsrate von J125 gezählt. (Zählzeit 10 Minuten).

Die Berechnung der Insulinkonzentration in $\mu\text{E/ml}$, aus der Zählrate von J125-Ins, erfolgte anhand einer Eichkurve aus einer Standardverdünnungsreihe. Diese Standardproben wurden im Probenansatz mitpipetiert.

Reagenzien (CEA Sorin, INSUK-1):

J125-Insulin: 1.25 μCi J125-Ins, Rinderalbumin und Konservierungsstoffe ad 10 ml H O

Insulinstandard: 1,0 mE H-Ins, Rinderalbumin und Konservierungsstoffe ad 5 ml H O

Insulinbindungsreagenz: Meerschweinchenserum (normal), Rinderalbumin und Konservierungsstoffe

Phosphatpuffer: Natriumphosphatpuffer pH 7,4 Rinderalbumin ad 200 ml H O

Filterpapier Firma Schleicher und Schüll, CA-250/0

Glasfritten, Porengröße 20 μm Labor Bottermann, P.,
Univ.-Klinik r.d.l. der
TU München

γ -Zählgerät BF 5300 Firma Bertold, München

Für die Bestimmung der einzelnen Proben wurden jeweils zwei Parallelwerte aus dem Serum entnommen.

Anhang: 3

Herstellung der radioaktiven Injektionslösung

Stand.: 10 nl in 1,5 ml phys. NaCl

Injektionslösung: Spez. Akt. H-Insulin	0,1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$
Spez. Akt. H-Proinsulin	0,05 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$
Gesamtimpulszahl	ca. 7×10^6 cpm

Im einzelnen wurde die Injektionslösung wie folgt hergestellt

IV und IP H-Ins:	0,100 ml J125 H-Ins (0,7-0,8 μCi)
	0,094 ml H- Ins 1:10 (Plasmagel)
	0,806 ml Plasmagel

	1.000 ml Injektionslvolumen

IV und IP H-Pro	0,100 ml J125 H-Pro (0,7-0,95 μCi)
	0,252 ml H-Pro
	0,648 ml Plasmagel

	1.000 ml Injektionsvolumen

SC H-Ins:	0,200 ml J125 H-Ins (1,5-1,7 μCi)
	0,188 ml H-Ins 1:10 Plasmagel
	0,612 ml Plasmagel

	1,000ml Injektionsvolumen

SC H-Pro:	0,200 ml J125 H-Pro (1,4- 1,9 μCi)
	0,504 ml H-Pro
	0,296 ml Plasmagel

	1,000 ml Injektionsvolumen

Anhang: 4 J125-Human-Insulin
 Glucose mg/dl
 Impulsrate cpm/0,5ml

Min.	cpm	γ	BG	δ
0	---	---	124,7	4,5
5	108,2	58,3	115,0	5,5
10	61,1	31,0	83,1	6,0
15	50,9	5,6	62,0	5,5
20	59,4	21,3	58,5	5,6
25	48,3	9,7	66,1	6,6
30	49,2	9,4	75,0	8,6
40	46,8	7,6	84,8	9,6
50	44,9	8,7	93,5	9,1
60	43,6	11,1	99,5	9,2
70	42,7	11,0	103,1	7,1
80	42,8	11,0	107,1	7,5
90	42,5	10,5	109,1	7,4
100	42,9	10,1	113,0	7,8
120	49,6	23,7	113,6	7,8

Min.	cpm	γ	BG	δ
0	---	---	124,7	4,5
10	2,0	1,3	115,6	6,6
20	4,5	3,1	111,3	8,0
30	8,0	6,1	92,7	7,9
40	8,8	5,2	82,7	6,7
50	11,1	4,9	73,3	11,5
60	13,7	6,1	72,5	10,5
70	15,5	5,7	71,2	8,7
80	15,5	7,0	70,3	9,3
90	18,8	6,1	73,0	6,6
100	19,4	6,1	77,3	8,3
120	22,9	9,7	87,2	8,0
140	23,3	6,8	92,0	8,8
160	26,4	9,8	96,0	7,7
180	25,5	7,7	100,8	8,2
200	23,5	16,5	102,7	9,5
220	20,4	12,9	106,1	12,1
240	20,4	14,0	106,8	11,2

IV

SC

Min.	cpm	γ	BG	δ
0	---	---	124,7	4,5
5	8,5	6,7	128,5	11,3
10	13,8	11,5	114,5	15,2
20	17,1	14,2	99,3	18,0
30	28,5	10,9	95,7	11,0
40	28,9	14,3	91,7	8,2
50	26,8	15,5	92,1	11,1
60	15,1	14,9	96,4	7,8
70	23,6	15,2	102,1	8,3
80	16,9	15,6	111,0	11,0
100	31,6	12,4	119,5	13,3
120	26,7	18,6	120,9	9,9

IP

Anhang:5 J125-Human-Proinsulin
 Glucose mg/dl
 Impulsrate cpm/0,5 ml

IV					IP				
Min.	cpm	Σ	BG	Σ	Min.	cpm	Σ	BG	Σ
0	---	---	124,7	4,5	0	---	---	124,7	4,5
5	138,7	35,9	108,3	8,0	5	9,7	4,4	120,7	9,8
10	94,3	26,1	92,0	11,3	10	12,4	5,3	111,9	10,2
15	84,1	18,7	75,2	13,6	15	16,0	7,9	105,5	11,4
20	73,6	18,6	68,5	13,4	20	16,4	7,1	98,3	3,6
25	72,5	30,9	68,3	13,8	25	31,7	9,7	93,1	4,6
30	63,6	20,1	71,8	15,8	30	26,1	15,1	91,9	13,6
40	59,9	18,2	78,8	12,7	40	27,8	14,2	89,1	15,3
50	60,8	17,4	76,8	13,9	50	36,6	12,1	82,1	14,2
60	55,3	17,7	81,3	12,9	60	31,0	12,1	83,5	15,3
70	58,4	11,6	84,6	13,0	70	32,0	12,5	82,1	17,9
80	45,3	17,4	85,5	18,3	80	30,0	19,0	83,7	16,0
90	52,6	26,9	86,5	17,5	90	29,4	12,5	80,3	19,1
100	40,0	18,0	89,8	15,9	100	26,4	11,3	80,3	16,0
120	47,8	26,2	90,6	14,9	120	23,5	10,3	85,9	15,8
140	36,4	17,2	96,7	13,0	140	17,5	7,2	94,9	14,5
160	40,7	24,7	102,5	8,2	160	14,1	9,5	99,9	11,5
180	40,7	26,0	106,3	9,4	180	6,2	3,8	105,5	12,5

SC				
Min.	cpm	Σ	BG	Σ
0	---	---	124,7	4,5
10	7,6	6,3	122,5	7,2
20	12,6	8,1	116,5	7,2
30	24,4	14,0	108,5	4,7
40	26,4	13,2	103,5	
50	37,1	21,1	98,9	6,2
60	35,1	13,9	88,1	6,2
70	39,4	14,4	83,6	14,1
80	40,8	8,1	79,7	14,3
90	32,2	18,9	80,5	9,9
100	41,8	8,4	84,4	10,3
120	42,4	8,4	97,9	7,4
140	42,7	7,8	101,5	9,4
160	40,1	7,9	103,8	8,2
180	52,2	9,6	103,8	8,1
200	56,3	16,0	104,1	6,5
220	57,6	9,8	105,0	7,7
240	47,2	24,8	103,1	7,7

Anhang: 6 J125-Human-Insulin und J125-Human-Proinsulin
Glucose mg/gl
Impulsrate cpm/0,5 ml

IV					IP				
Min.	cpm	σ	BG	σ	Min.	cpm	σ	BG	σ
0	---	---	124,7	4,5	0	---	---	124,7	4,5
5	49,1	9,1	114,3	5,6	10	10,6	9,6	120,7	3,7
10	44,2	9,9	105,5	2,9	20	15,5	14,2	106,8	5,0
15	43,0	12,3	90,5	5,5	30	22,2	19,1	90,3	5,1
20	40,1	11,0	80,7	8,4	40	26,9	21,4	79,0	14,0
25	37,5	6,2	54,7	9,5	50	35,6	18,7	80,3	19,4
30	37,0	7,7	54,9	11,5	60	36,2	16,2	78,0	16,5
40	34,3	7,6	59,5	10,3	70	46,8	23,0	81,0	15,6
50	30,1	5,3	67,5	9,7	80	52,6	22,8	84,0	13,0
60	32,3	9,1	70,3	8,5	90	57,9	23,4	90,6	12,1
70	32,1	9,1	79,7	11,5	100	61,6	12,4	93,3	9,9
80	32,1	10,7	83,1	9,1	120	51,8	17,8	102,8	12,5
90	29,0	9,4	87,5	4,9	140	52,3	19,5	107,5	8,2
100	27,0	8,9	95,3	5,4	160	42,3	22,6	109,6	7,6
120	25,6	5,9	96,1	12,2	180	42,3	22,6	110,0	7,4
140	21,2	1,7	102,7	8,5					
160	23,0	3,0	105,3	5,4					

SC				
Min.	cpm	σ	BG	σ
0	---	---	124,7	4,5
10	5,3	2,9	123,1	8,4
20	9,3	6,8	112,9	12,7
30	6,9	4,1	105,9	11,8
40	5,8	2,2	96,7	7,4
50	7,1	2,5	87,5	11,8
60	8,5	2,7	83,1	9,9
70	10,2	3,9	76,1	5,7
80	13,0	5,0	69,5	7,6
90	9,8	7,2	74,9	3,5
100	12,9	3,6	77,3	6,4
120	15,5	4,1	86,5	6,0
140	17,8	3,3	92,1	8,4
160	19,9	5,2	98,1	6,0
180	25,7	5,7	102,9	4,0
200	21,8	6,1	106,5	5,1
220	19,9	9,0	108,5	7,5
240	17,7	13,7	108,5	9,1

10. Literatur

=====

Berson, S. A. and Yalow, R. S.: Insulin-J131 metabolism in human subjects. J. Clin. Invest. 35, 170-190 (1976)

Breuer, H.: Methoden der Hormonbestimmung, Thieme Stuttgart 1975

Burnett, J. P.: Gentechnologie in: Vortragsmanuskript v. Euro. Forschungsforum BHI, Lilly Center, Indianapolis (1982)

Chance, R. E., Ellis, R. M. and Bromer, W. W.: Porcine proinsulin: Characterisation and amino acid sequence. Science, 161, 165-167 (1968)

Frank, B. H. and Veros A. J.: Physical studies on proinsulin-association behavior and conformation in solution. Biochem. Biophys. Res. Comun. 32, 155-160 (1972)

Fineberg, S. E.: Proinsulin: metabolic effect in the human forearm, Science, 167, 998-999 (1970)

Freychet, P.: Interaction of proinsulin with insulin receptors on the plasmamembran of the liver. J. Clin. Invest., 54, 1020-1031 (1974)

Galloway, J. A.: In vivo studies of the hypoglycemic activity of porcine proinsulin. Diabetes 18, 341 (1969)

Galloway, J. A., Rathmacher, R. P., Root, M. A., Crabtree, R. E., and Chance, R. E.: The effects of low dosis of intravenous proinsulin and insulin combinations in normal fasted man. J. Lab. & Clin. Med. 78, 991 (1971)

Gliemann, J. and Sorensen, H. H.: The biological activity of proinsulin. Diabetes 18, 347 (1969)

Hepp, K. D., Einführung in die Biochemie und Pathophysiologie des Stoffwechsels. Diabetologie in Klinik und Praxis. Thieme Stuttgart 1984

Kirsch, L. E.: Pharmacodynamic studies of human proinsulin alone and in combination with human insulin in dogs and rabbits. Eli Lilly and Comp. Clin. Invest. Manual (1984)

Kitabchi, A. E.: The biological and immunological properties of pork and beef insulin, proinsulin and connecting peptides. J. Clin. Invest. 49, 979 (1970)

Kitabchi, A. E., Duckworth, W. C., Brush, J. S. and Heinemann, M.: Direct measurement of proinsulin in human plasma by the use of an insulin-degrading enzyme. J. Clin. Invest. 50, 1792 (1971)

Lazarus, N. R., Penthos, J. C., Tanese, T., and Michaels, L.: Studies on the biological activity of porcine proinsulin. J. Clin. Invest., 49, 487-496 (1970)

Melani, F. M., Rubenstein, A. H., and Steiner, D. F.: Human serum proinsulin. J. Clin. Invest., 49, 497-507 (1970)

Melani, F. M. and Ryan, W. G.: Proinsulin secretion by a pancreatic B-cell adenoma. New Eng. J. Med. 283, 714 (1970)

Oyer, P. E. and Ko, S.: Isolation and structure of human proinsulin. J. Biol. Chem., 246, 1375, (1971)

Patzelt, C., Labrecque, A. D., Duquid, J. R. and Steiner D. F.: Features and function of proinsulin precursor. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1260 (1978)

Podlecki, D. A., Frank, B. H., and Olefsky, J. M.: In vitro characterisation of biosynthetic human proinsulin. Diabetes, 33, 111-118 (1982)

Prager, R. and Schernthaner, G.: Receptor binding properties of human insulin and human proinsulin and their interaction at the receptor site. Diabetes care, 5, 104-106 (1982)

Puls, W. and Kroneberg, G.: Experimentelle Untersuchungen über die blutzuckersenkende Wirkung von Rinder-Proinsulin. Diabetologia, 5, 325-330 (1969)

Revers, R. R.: Biosynthetic human insulin and proinsulin have additiv but not synergistic effects on total body glucose disposal. J. Clin. Endocr. and Metab. 58, 1094-1095 (1984)

Rubenstein, A. H., Starr, J., Melani, F., and Steiner, D. F.: Proinsulin and C-Peptide in blood. *Diabetes*, 21, 661-672 (1972)

Rubenstein, A. H. and Steiner, D. F.: Proinsulin : The single chain precursor of proinsulin. *Med. Clin. N. Am.*, 54, 191-199 (1970)

Schatz, H.: Vergleichende Untersuchung zur biologischen Aktivität von biosynthetischem Human-Proinsulin in vivo sowie zur Frage des Wirkungsmechanismus. 18. Jahrestag der Dtsch.Diabetesgesellschaft, Mai 1984

Schernthaler, G., Borkenstein, M., Mathä, R., and Mayr, W. R.: Semisynthetisches und biosynthetisches Humaninsulin in: *Neue Insuline*, Freiburger Graphische Betriebe 140-148 (1982)

Schlüter, K. J., Petersen, K. G., Enzmann, F. Kerp, L.: Enhancement of human insulin binding to human monocytes by human proinsulin. *Diabetes* 31, 135A (1982)

Schlüter, K. J., Petersen, K. G. and Frank, B.: Stimulation der Insulinbindung durch Proinsulin. *J. Clin. Endocr. Metab.* 2, 290 (1982)

Sherman, B. M.: The proinsulin like properties of "Big Insulin" in patients without islet cell tumors. *J. Clin. Invest.*, 50, 849-858 (1971)

Steiner, D. F. and Oyer, P. E.: The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 57: 473-480 (1967)

Steiner, D. F., Clark, J. L., Nolan, C., and Rubenstein, A. H.: Proinsulin and the biosynthesis of insulin. *Rec. Progr. in Hormone Research*, 25, 207-282 (1969)

Steiner, D. F.: Insulin today. *Diabetes*, 26, 322-340 (1977)

Steiner, D. F.: Evidence for c-peptide and proinsulin secretion following recovery. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 35, 402 (1972)

Stoll, R. W. , Touber, J. L., and Winterscheid, L. C.:
Hypoglycemic activity and immunological half-life of
porcine insulin and proinsulin. Endokrinologie, 88, 714-
717 (1972) —

Yalow, R. S. and Berson, S. A.: Plasma insulin in man.
Amer. J. Med. 29 (1960)

Herrn Prof. Dr. K. D. Hepp danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die großzügige Förderung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Kriegel danke ich für die Möglichkeit, die praktische Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Herrn Oberarzt Dr. R. Renner danke ich für die Überlassung des aktuellen Themas und sein kritisches und förderndes Interesse.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dr. K. Piwernetz. Seine Anregung zu dieser Arbeit, seine Ratschläge während der Durchführung und seine stete Hilfsbereitschaft waren mir eine große Hilfe.

Herrn Dr. G. Jackl danke ich für die freundschaftlichen Ratschläge, die zum Gelingen der praktischen Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Schließlich bedanke ich mich von Herzen bei allen Freunden, deren Unterstützung und Verständnis mir die Durchführung der Arbeit sehr erleichtert haben.

Lebenslauf

1943 Christine Kalteis am 22.Feb.
in Ostermünchen geboren

Kindheit in Ostermünchen

Ausbildung

1949 - 1961 Volksschule/Gymnasium Rosenheim
1961 - 1964 Chemieschule Dr. E. Elhardt, München

1966 Sprachaufenthalt Dublin,
1968 Nizza und
1970 New York

Berufstätigkeit als Chemotechnikerin

1964 - 1970 Inst. für Pflanzenphysiologie, München
ab Juni 1969, in Bochum
bei Herrn Prof. Dr. M. H. Zenk

1971 - 1973 Pharm. Fa. Klinge, München
bei Herrn Dr. E. Hofrichter

1974 - 1975 Deutsches Herzzentrum München
bei Herrn Prof. Dr. H. Schievelbein

während der Berufstätigkeit

1972 - 1974 Abendgymnasium München
30. 6. 1974 Begabtenabitur vor dem Bayer.
Kultusministerium, München

Studium der Medizin

1976 - 1978 Universität Regensburg
1978 - 1983 Technische Universität, München

1978 - 1983 Institut für Klinische Chemie
bei Herrn Prof. Dr. A. Oberdorfer

1983 - 1984 Durchführung der vorliegenden Arbeit
Abteilung für Nuklearbiologie
Gesellschaft für Strahlen- und
Umweltforschung Neuherberg

Berufstätigkeit als Assistenzärztin

1984 - 1985 Städt. Krankenhaus Bogenhausen
bei Herrn Prof. Dr. K. D. Hepp

1985 Praxis Dr. A. Dettmann, München

